

Санкт-Петербургский Государственный университет

Филимонова Ксения Сергеевна

**Исследование механизмов проэпилептического действия цефалоспориновых  
антибиотиков**

Выпускная квалификационная работа  
по направлению подготовки "Биология"  
основная образовательная программа бакалавриата "Биология"

Работа выполнена в лаборатории молекулярных  
механизмов нейронных взаимодействий  
Института эволюционной физиологии и  
биохимии им. И.М. Сеченова РАН  
(зав. лаб. – д.б.н. Зайцев А. В.)

Научный руководитель:

с.н.с., д.б.н. Вольнова Анна Борисовна

Научный консультант:

в.н.с., к.б.н. Амахин Дмитрий Валерьевич

Санкт-Петербург

2018

## Оглавление

1. Введение .....	5
2. Обзор литературы .....	7
2.1. Эпилептизация мозга как результат нейротоксичности антибиотиков .....	7
2.2. Общие сведения о бета-лактамных антибиотиках .....	8
2.2.1. Цефалоспориновые антибиотики .....	8
2.3. Просудорожные эффекты цефалоспориновых антибиотиков.....	10
2.3.1. Исследования вызванных цефалоспоринами судорожных состояний у экспериментальных животных .....	10
2.3.2. Клинические наблюдения нейротоксичности цефалоспоринов.....	12
2.3.3. Нейротоксические эффекты цефепима .....	13
2.3.4. Нейротоксические эффекты цефтриаксона .....	14
2.3.5. Нейропротективное действие цефтриаксона.....	15
2.4. ГАМКэргическая система и ее роль в эпилептогенезе .....	16
2.4.1 Ионотропные ГАМКа-рецепторы.....	17
2.4.2. ГАМКа-рецепторы в эпилептогенезе .....	19
2.4.2. Эффект бета-лактамных антибиотиков на ионотропные ГАМКа-рецепторы .....	20
3. Материалы и методы исследования.....	22
3.1 Животные и подготовка объекта исследования.....	22
3.2. Изоляция пирамидных нейронов .....	22
3.3. Регистрация постсинаптических токов в переживающих срезах .....	23
3.4. Регистрация ответов изолированных нейронов на аппликации ГАМК в присутствии цефалоспоринов .....	24
3.5. Обработка экспериментальных данных .....	25
3.6. Статистическая обработка .....	26
4. Результаты и обсуждения .....	27
4.1. Цефалоспорины блокируют вызванные экстраклеточной стимуляцией тормозные постсинаптические токи (вТПСТ).....	27

4.2. Цефепим и цефтриаксон по-разному влияют на кинетику спада вызванного тормозного постсинаптического тока.....	30
4.3. Оценка эффективности блока ответа на аппликацию ГАМК цефалоспоринами .....	32
5. Выводы .....	34
6. Список литературы.....	35

### **Список используемых сокращений**

BMI – бикикуллина йодметилат

DNQX – 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион

IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования

МК-801 – дизоцилпин

NMDA – N-метил-D-аспарагиновая кислота

вТПСТ – вызванный тормозный постсинаптический ток

ГАМК – γ-аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ЦНС – центральная нервная система

ЭЭГ – электроэнцефалограмма

## 1. Введение

Многие современные антибиотики могут проявлять нейротоксические свойства, в частности приводить к возникновению судорожных состояний. Подобные побочные эффекты особенно характерны для бета-лактамовых антибиотиков, включающих в себя пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобакты. Эти антибиотики широко применяются при бактериальных инфекциях и являются наиболее многочисленной группой антибактериальных средств по количеству применяемых в клинике препаратов. При этом на долю бета-лактамовых антибиотиков приходится больше половины сообщений о нейротоксических побочных эффектах антимикробных препаратов у пациентов [Cock, 2015].

Цефалоспорины являются антибиотиками широкого спектра действия и часто назначаются при таких бактериальных инфекциях, как пневмония, перитонит, бактериальный менингит, инфекции костей и суставов. С появлением цефалоспоринов первого поколения сообщается об их нейротоксичности, одним из проявлений которой могут быть эпилептические приступы. Пожилой возраст и почечная недостаточность являются факторами риска возникновения проэпилептического эффекта, также к появлению симптомов эпилепсии может приводить превышение дозировки антибиотика. Примерно в трети описанных случаев нейротоксичности цефалоспоринов возникали клонические спазмы мышц, в более 10% случаев наблюдались явные судорожные припадки и примерно такое же количество случаев характеризовались неконвульсивным эпилептическим статусом, видимым на ЭЭГ [Grill and Maganti, 2008].

В целом, механизм проэпилептического действия цефалоспоринов остается малоизученным. В настоящее время считается, что цефалоспорины приводят к возникновению судорожного состояния благодаря своей способности конкурентно связываться с ГАМК-рецепторами и блокировать тормозное действие ГАМК, что приводит к возникновению эпилептических симптомов [Sugimoto et al., 2003]. В то же время, непосредственных свидетельств в пользу участия данного механизма в генерации судорожной активности не публиковалось. Также есть основания считать, что данный механизм - не единственный, который следует принимать во внимание в исследовании эпилептогенного действия этих веществ: существует ряд свидетельств влияния антибиотиков на другие рецепторные системы. Например, цефтриаксон - антибиотик III поколения цефалоспоринового ряда широкого спектра действия, увеличивает уровень экспрессии транспортера глутамата GLT1 [Jelenkovic et al., 2008].

**Целью** данного исследования является изучение влияния цефалоспориновых антибиотиков на ГАМК-опосредованную синаптическую передачу в головном мозге.

Для достижения данной цели поставлены следующие **задачи**:

- описать эффекты цефалоспоринов на вызванные тормозные постсинаптические токи (вТПСТ) в переживающих срезах энторинальной коры и гиппокампа крысы;
- определить концентрации цефалоспоринов, необходимых для эффективного блокирования тормозной синаптической передачи в срезах коры головного мозга крысы;
- исследовать непосредственный блокирующий эффект различных цефалоспоринов (цефтриаксона и цефепима) на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы изолированных нейронов энторинальной коры головного мозга крысы.

## **2. Обзор литературы**

### **2.1. Эпилептизация мозга как результат нейротоксичности антибиотиков**

Международная противэпилептическая лига (ILAE) определяет эпилепсию как хроническое нарушение работы головного мозга, характеризующееся предрасположенностью к повторяющимся неспровоцированным эпилептическим приступам [Fisher et al., 2014]. По данным Всемирной организации здравоохранения более 50 млн человек в мире больны эпилепсией, ежегодно эта болезнь диагностируется у 2,5 млн человек.

Эпилепсия — это целая группа психоневрологических заболеваний. Согласно этиологической классификации выделяют идиопатический и симптоматический типы данного заболевания. Идиопатическая эпилепсия является врожденной и может иметь различные механизмы возникновения. Симптоматическая (вторичная) эпилепсия возникает по ряду причин: родовая травма или гипоксия, травма головы, инсульт, инфекция мозга, опухоль мозга, влияние конвульсантов (в том числе антибиотиков). [Гусев и др., 2009].

К веществам просудорожного действия относят некоторые лекарственные средства, наркотики, яды растительного и животного происхождения, а также различные химически опасные вещества окружающей среды. Действие конвульсантов приводит к нарушению баланса между процессами возбуждения и торможения, протекающими в головном мозге. Основными мишенями конвульсантов являются возбуждающие холинэргическая и глутаматэргическая, а также тормозные глицинэргическая и ГАМКэргическая медиаторные системы [Петров и др., 2017].

Многие современные широко применяющиеся в клинических условиях антибиотики могут проявлять нейротоксические свойства и приводить к появлению судорог, энцефалопатии, оптической или периферической нейропатии [Bhattacharyya et al., 2014]. При антибиотико-индуцированном судорожном синдроме наблюдают как тонико-клонические судороги, так и неконвульсивный эпилептический статус, проявляющийся в нарушениях сознания и диагностирующийся благодаря наличию эпилептиформных паттернов на электроэнцефалограмме (ЭЭГ) [Bora et al., 2016]. Возникновение эпилептического статуса после приема лекарственных препаратов, является достаточно редким явлением. Считается, что эпилептогенез вследствие приема антибиотиков составляет около 5% от всех случаев появления побочных эффектов, при этом смертность от симптоматических судорог, вызванных антибиотиками, может достигать 40% [Sutter et al., 2015].

К лекарственным препаратам, способным индуцировать возникновение эпилептической активности в головном мозге относят бета-лактамы, хинолоны, макролиды, изониазид [Sutter et al., 2015].

## **2.2. Общие сведения о бета-лактамах**

Бета-лактамы – это большое семейство высокоэффективных антибиотиков, применяющихся для лечения многих инфекционных заболеваний. По количеству применяемых в клинике препаратов – это наиболее многочисленная группа среди всех антибактериальных средств [Deshayes et al., 2017]. Бета-лактамы включают в себя такие группы, как пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобакты. Их объединяет бета-лактамоное кольцо, обеспечивающее бактерицидное действие данных антибиотиков, путем нарушения синтеза пептидогликанов наружной стенки бактерий [Селизарова, 2002].

Различные бета-лактамы применяются при лечении стрептококковых, пневмококковых, менингококковых, стафилококковых, энтерококковых, гонококковых и вызванных листериями инфекций [Сидоренко и др., 1997].

На долю бета-лактамов приходится больше половины сообщений о нейротоксических побочных эффектах у пациентов [Cock, 2015]. Их способность индуцировать судорожное состояние была обнаружена с началом применения пенициллина G [Ohtaki et al., 2004]. Появление эпилептических симптомов связывают с превышением дозировки антибиотика, нарушением работы почек или предшествующими расстройствами ЦНС [Sutter et al., 2015].

Основным механизмом нейротоксичности бета-лактамов считают ингибирование ионотропных ГАМК-рецепторов нейронов головного мозга. Также есть свидетельства, указывающие на увеличение высвобождения возбуждающего нейромедиатора глутамата и стимулирование выделения цитокинов, в частности фактора некроза опухоли-альфа [Grill et al., 2011]. Предполагается, что для различных групп бета-лактамов механизмы ингибирования ГАМК-рецепторов могут различаться [Zareifopoulos et al., 2017].

### **2.2.1. Цефалоспориновые антибиотики**

Цефалоспориновые антибиотики занимают первое место среди всех антимикробных препаратов по частоте применения [Anzellotti et al., 2011]. Популярность этих антибиотиков объясняется наличием у них многих положительных качеств, в их числе:

- широкий спектр антимикробного действия с учетом всех препаратов этого класса, охватывающий практически все микроорганизмы, за исключением энтерококков, хламидий и микоплазм;



- бактерицидный механизм действия;
- устойчивость к бета-лактамазам стафилококков у препаратов I и II поколений и грамотрицательных бактерий у препаратов III и IV поколений;
- хорошая переносимость и небольшая частота побочных проявлений;
- создание высоких концентраций в тканях и жидкостях внутренней среды;
- способность преодолевать гематоэнцефалический барьер у цефалоспоринов II и последующих поколений [Ohtaki et al., 2004].;
- простота и удобство дозирования [Селизарова Н.О., 2002].

Структурной основой цефалоспоринов являются 7-аминоцефалоспоровая и 7-аминодезацетоксицефалоспоровая кислоты, выделенная из гриба *Cephalosporium acremonium* в середине XX века. [Мостовой Ю.М., 2011].

К настоящему моменту синтезировано пять поколений цефалоспоринов, спектр антимикробной активности расширяется от поколения к поколению. В каждом поколении выделяют «базовые» препараты, являющиеся образцами для лекарств-прототипов. Цефазолин – цефалоспорин I поколения, активен в основном против грамположительных микроорганизмов, в настоящее время практически не назначается. Цефуроксим – представитель II поколения цефалоспориновых антибиотиков, часто применяется для лечения инфекций дыхательных путей, мочевыделительной системы и др. Базовыми препаратами III поколения считаются цефотаксим и цефтриаксон, эти антибиотики способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, в связи с чем применяются для лечения менингококковых инфекций. Кроме того, высокая активность против грамотрицательных микроорганизмов обуславливает их широкое применение для лечения больничных инфекций. Цефепим является ключевым препаратом VI поколения цефалоспоринов и обладает повышенной способностью проникать через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий. Цефепим применяется для лечения тяжелых инфекций, вызванных полирезистентной флорой, больничных пневмоний, тяжелых инфекций после операций. Цефтобипрол и цефтаролин – цефалоспорины V поколения, обладающие ярко выраженной активностью против метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* [Савенкова М.С., 2012].

В то же время прием цефалоспориновых антибиотиков может приводить к различным побочным эффектам. К настоящему моменту накоплено большое количество данных о появлении у пожилых пациентов с нарушенной функцией почек нейротоксических симптомов, таких как нарушения сознания, энцефалопатия, миоклонус, эпилептический статус и кома.

## 2.3. Просудорожные эффекты цефалоспориновых антибиотиков

### 2.3.1. Исследования вызванных цефалоспоринами судорожных состояний у экспериментальных животных

Введение цефалоспоринов экспериментальным животным в боковые желудочки головного мозга или внутривенно характеризуется появлением судорожной активности. Наблюдаемые поведенческие изменения ранжируются от тремора, клонуса конечностей и тонико-клонических судорог до генерализованного судорожного припадка, в некоторых случаях, заканчивающегося смертью, при этом первые эпилептические симптомы появляются в течение минуты после введения данных антибиотиков [Kamei et al., 1983; Sugimoto et al., 2003].

Было показано, что сила вызванных цефалоспоринами эпилептических симптомов (подергивания головы, клонус передних конечностей или судороги), а также изменения регистрируемой электроэнцефалограммы, зависят от концентрации вводимого антибиотика. Необходимая для возникновения судорог доза антибиотика при введении цефозелиса (цефалоспорин IV поколения) напрямую в мозг мыши составила 50 мкг [Yamazaki et al., 2002]. В случае внутривентрикулярного введения цефалоспоринов крысе наименьшая, требуемая для появления судорожной активности, доза цефазолина (цефалоспорин I поколения) была определена как 32 мкг. С другой стороны, для появления проэпилептического действия других представителей данной группы антибиотиков требовались более значительные концентрации. Например, 1000 мкг при использовании цефалексина (цефалоспорин I поколения) [Kamei et al., 1983].

Эпилептогенная активность цефалоспоринов, в структуре которых в положении боковой C-7 цепи 7-аминоцефалоспороановой кислоты находится тетразольное кольцо, цефазолина и цефтезола (I поколение) была выше других представителей данной группы антибиотиков [De Sarro et al., 1995]. По величине судорожного действия исследованные цефалоспорины четырех поколений были ранжированы в следующем порядке: цефазолин (I поколение) > цефозелис (IV) > цефотиам (II) > цефпиром (IV) > цефепим (IV) > цефтазидим (III) > цефозопрам (IV) [Sugimoto et al., 2003]. Таким образом степень проэпилептического эффекта различных представителей цефалоспоринов может зависеть от их структуры.

Данный вывод подтверждается исследованием влияния цефалоспоринов на поведение личинок *Danio rerio*, где показано, что сила эффекта, оказываемого антибиотиками на двигательную активность (увеличение времени плавания и скорости движения), зависит от структуры боковой C-3 цепи исследуемого цефалоспориона [Han et al., 2018].

Внутривенное введение мышам цефепима (цефалоспорин IV поколения) в концентрации 500 мг/кг приводило к появлению характерных спайков на ЭЭГ, однако не приводило к появлению судорог, а также не оказывало влияния на пентилентетразол-индуцированные судороги. При создании эпилептоподобного состояния с помощью использования электрической стимуляции сетчатки у мышей введение цефепима значительно увеличило время судорог [Tanaka et al., 2014]. Внутривенное введение цефозелиса (цефалоспорин IV поколения) крысам в концентрации 1000 мг/кг вызывало судороги только у животных с почечной недостаточностью [Ohtaki et al., 2004].

Цефалоспорины обладают разной способностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Среднее количество цефозелиса, который при внутривенном введении крысам проходит через гематоэнцефалический барьер, составило 10 – 20%. Внутривенное введение цефазолина (цефалоспорин I поколения) не подтвердило его способность преодолевать ГЭБ [Ohtaki et al., 2004].

У крыс с индуцированной почечной недостаточностью судороги возникали при концентрациях антибиотика меньших, чем требовались здоровым животным. Данный факт позволяет предположить, что почечная недостаточность может являться фактором риска для развития эпилептических симптомов в терапии у пациентов [Nagata and Yasuhara, 2001].

Для определения мишени цефалоспориновых антибиотиков в ЦНС использовались антиконвульсанты с известными механизмами действия, которые применялись перед внутрижелудочковым введением цефозелиса. В качестве антиконвульсантов использовали антагонист NMDA-рецепторов глутамата МК-801 и агонисты ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов диазепам и фенобарбитал, данные вещества эффективно предотвращали развитие судорожного состояния у животных. Также сравнивались характеристики судорожных эпизодов, вызванных цефозелисом, ВМІ – антагонистом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов и NMDA – антагонистом NMDA-рецепторов глутамата. Эффекты, вызванные цефозелисом были сходны с эффектами, возникающими после применения ВМІ. Полученные данные позволяют сделать вывод об ингибирующем действии цефалоспоринов на ГАМК<sub>A</sub>-рецептор опосредованную тормозную синаптическую передачу [Yamazaki et al., 2002]. Возможно цефалоспорины могут влиять и на возбуждающую глутамат опосредованную передачу, например, было показано, что введение цефозелиса в гиппокамп крысы значительно увеличивало количество внеклеточного глутамата [Ohtaki et al., 2004]. Тем не менее вывод о том, что мишенью цефалоспоринов являются ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, подтверждается также исследованиями *in vitro*.

### **2.3.2. Клинические наблюдения нейротоксичности цефалоспоринов**

С появлением цефалоспоринов первого поколения сообщается об их нейротоксичности, проявляющейся в разных случаях от энцефалопатии до бессудорожной эпилепсии. Нейротоксическим эффектом обладают цефалоспорины всех поколений [Grill and Maganti, 2008], но наибольшее число сообщений приходится на антибиотик первого поколения цефазолин и антибиотик четвертого поколения цефепим [Sutter et al., 2015]. Также в ветеринарной медицине описаны случаи появления у собак судорог, как побочных эффектов после применения цефазолина (цефалоспорина I поколения) [Griffith and Hoffmann., 2013].

Нейротоксический эффект цефалоспоринов может клинически проявляться как спутанность сознания, временно-пространственная дезориентация, энцефалопатия, миоклонус, афазия, тремор, психоз, эпилептический статус, бессудорожная эпилепсия, судороги, кома. Наиболее распространенными побочные симптомы головная боль и головокружение проявляются у 3,2% пациентов [Grill et al., 2008]. Неврологические симптомы регистрируются на 3-6 день приема антибиотика.

В случае внутривенного введения цефалоспоринов (цефепим, цефтриаксон) пациентам с острой или хронической почечной недостаточностью может появляться неконвульсивный эпилептический статус, регистрируемый с помощью ЭЭГ. В работе Бора и соавторов [Bora et al., 2016] продемонстрировано, что несмотря на компенсацию дозы антибиотика с учетом диагноза (2-4 мг/сут), эпилептические симптомы появлялись от 2 до 8 дней после начала приема препарата. После прекращения терапии цефалоспоринами неврологический статус возвращался к норме в течение 7 дней.

Электроэнцефалограмма пациентов с проявлениями нейротоксического эффекта цефалоспоринов имеет характерные признаки эпилептогенного состояния. На ЭЭГ уменьшается базовая активность, повышается активность тета- и дельта-волн, появляются характерные спайки. Неврологический и электроэнцефалографический статус может вернуться к норме после отмены антибиотика. ЭЭГ возвращается к норме в случае отмены цефалоспорина, в некоторых случаях требуется диализ или применение положительных модуляторов ГАМКа-рецепторов – бензодиазепинов [Chow et al., 2003].

Превышение дозировки антибиотика может приводить к появлению симптомов эпилепсии. Пожилой возраст и почечная недостаточность являются признанными факторами риска возникновения нейротоксического эффекта. 50% случаев нейротоксического эффекта связано с почечной недостаточностью, еще половину составляют пожилой возраст и наличие других неврологических заболеваний [Cock, 2015]. Повышенный риск проявления нейротоксичности антибиотиков у пожилых людей

и пациентов с нарушением функции почек объясняется такими факторами как повышенная концентрация лекарства в крови, увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера, изменение структуры белков, накопление токсических органических кислот в цереброспинальной жидкости. Продemonстрировано, что в условиях повышенной дозировки и сниженного почечного клиренса, цефалоспорины могут накапливаться в цереброспинальной жидкости [Chow et al., 2003].

### 2.3.3. Нейротоксические эффекты цефепима

Цефепим – цефалоспориновый антибиотик четвертого поколения, активный против грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий (рис.1). Он был одобрен для клинического использования в 1996 году и остается главным компонентом парентеральной терапии нейтропенической лихорадки и внутрибольничных инфекций, включая пневмонию, инфекции мочевыводящих путей, кожи и мягких тканей и др. [Bazan et al., 2011]. Приблизительно 10% цефепима, который находится в крови, может проникать через гематоэнцефалический барьер в ЦНС [Durand-Maugard et al., 2012].

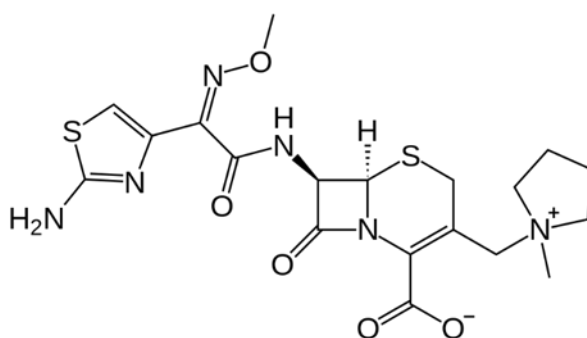


Рис.1. Химическая структура цефепима – цефалоспорина IV поколения

Многие исследователи сообщают о повышенном риске побочных эффектов вплоть до смертности при приеме цефепима [Deshayes et al., 2017]. Часто сообщается о возникновении нейротоксических симптомов у людей пожилого возраста с почечной недостаточностью. [Seon-Yu Kim et al., 2012]. Смертность, вызванная нейротоксическими эффектами цефепима, выше, чем у других бета-лактамовых антибиотиков. [Yahav et al., 2007].

Нейротоксичность цефепима проявляется в 1 из 480 случаев приема антибиотика. При этом миоклонус проявлялся в 40% случаев, примерно в трети случаев наблюдается бессудорожный эпилептический статус, в 11% случаев отмечалась судорожная активность. Авторы подчеркивают, что средний возраст пациентов с симптомами

нейротоксичности составлял 67 лет, а также в 87% рассмотренных случаях у пациентов была почечная недостаточность [Appa et al., 2017].

Нейротоксические симптомы цефепима могут проявляться как снижение когнитивных способностей, помутнение сознания, афазия, миоклонус, судороги и кома [Payne et al., 2017; Khasani et al., 2015]. Также сообщается о возможности возникновения неконвульсивного эпилептического статуса и необходимости мониторинга ЭЭГ [Chang, 2013]

При лечении тяжелых инфекций, таких как фебрильная нейтропения, требуются высокие дозы данного антибиотика (6 г/сутки), при этом у некоторых пациентов наблюдается появление побочных эффектов, таких как спутанность сознания, галлюцинации, когнитивные нарушения, миоклонус, вплоть до смерти. Было показано, что высокая концентрация цефепима в сыворотке крови (более 22 мг/л), возникающая из-за почечной дисфункции коррелирует с появлением неврологических нарушений. Снижение дозировки или полная отмена препарата в большинстве случаев приводили к улучшению состояния и исчезновению нейротоксических симптомов [Lamoth et al., 2010].

Механизмы нейротоксичности цефепима остаются малоизученными, но считается, что он является конкурентным антагонистом ГАМК. Еще одним механизмом нейротоксичности цефепима может быть индукция выделения эндотоксинов и цитокинов. [Grill and Maganti, 2008].

Появление симптомов связывают со снижением клиренса антибиотика при нарушении функции почек и увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Основными факторами риска, которые могут привести к появлению нейротоксических эффектов цефепима, являются нарушения работы почек и превышение дозировки антибиотика, а также пожилой возраст и нарушенная проницаемость ГЭБ [Payne et al., 2017].

#### **2.3.4. Нейротоксические эффекты цефтриаксона**

Цефтриаксон – цефалоспорин третьего поколения (рис.2), обладающий широким спектром антимикробной активности и длительным периодом полувыведения (до 9 часов), что отличает его от других цефалоспоринов. Кроме того, известно, что цефтриаксон может метаболизироваться в печени, что также обеспечивает ему преимущество перед другими бета-лактамами и его широкое применение даже у пациентов с почечной недостаточностью [Kim et al., 2012].

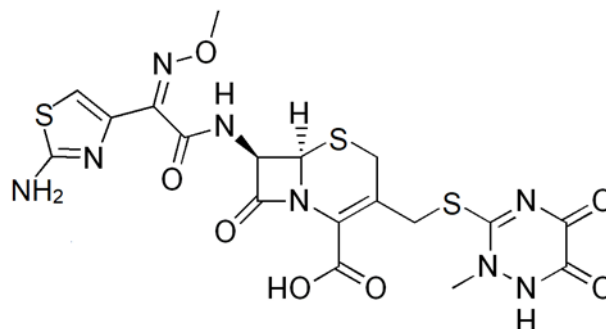


Рис.2. Химическая структура цефтриаксона – цефалоспорины III поколения

Тем не менее появляются сообщения о нейротоксичности цефтриаксона. Применение этого антибиотика у пациентов с нарушением функции почек, может приводить к различным неврологическим нарушениям. У пациентов может наблюдаться миоклонус и бессудорожный эпилептический статус, которые проходят после отмены антибиотика [Nagiya et al., 2017].

Также сообщается о развитии энцефалопатии у пациентов с почечной недостаточностью после приема цефтриаксона. Предполагается, что у пациентов с хроническими болезнями почек период полувыведения цефтриаксона увеличивается в 2 раза, что приводит к повышению концентрации антибиотика в крови и спинномозговой жидкости [Safadi et al., 2014].

В целом, по количеству проявлений нейротоксического эффекта цефтриаксон считается более безопасным препаратом, чем цефепим [Grill et al., 2011].

### 2.3.5. Нейропротективное действие цефтриаксона

Некоторые цефалоспорины наряду с проэпилептическим также могут оказывать и антиэпилептическое действие путем снижения концентрации возбуждающего медиатора – глутамата в синаптической щели. Данный эффект реализуется за счет влияния на транспортеры глутамата, локализованные на мембране нейронов и астроцитов, обеспечивающие поглощение глутамата из внеклеточного пространства [Cock, 2015]. Транспортер глутамата GLT1 представлен в ЦНС наиболее широко. Фармакологические блокаторы данного транспортера приводят к повышению экстраклеточной концентрации глутамата и смерти нервных клеток [Rothstein et al., 1996].

Показано, что цефтриаксон активирует промотор гена GLT1, что приводит к увеличению уровня экспрессии данного транспортера на мембранах астроцитов. При внутрибрюшинном введении цефтриаксона мышам через 7 дней наблюдали трехкратное увеличение концентрации исследуемых транспортеров в мозге [Rothstein et al., 2005].

При изучении влияния цефтриаксона на индуцированную пентилентетразолом эпилептиформную активность было показано, что добавление цефтриаксона снижало

количество характерных спайков и сокращало время судорог. Позитивный эффект цефтриаксона сильнее выражался при высокой концентрации (400 мг/кг) [Uyanikgil et al., 2015]. Предварительно введенный цефтриаксон снижает проявления пентилентетразол-индуцированной эпилепсии и сокращает количество животных, погибающих от ее симптомов. Исследователи отмечают, что 12-недельные мыши были более чувствительны к цефтриаксону по сравнению с 4-недельными, что может быть связано с возрастными изменениями уровня экспрессии генов, в частности транспортера глутамата GLT1 [Jelenkovic et al., 2008]. В канин-опосредованной модели нейротоксичности также показано защитное действие цефтриаксона через значительное увеличение экспрессии GLT1 [Bajrektarevic et al., 2017].

Цефтриаксон предотвращал снижение уровня GLT1 и в модели посттравматической эпилепсии, что уменьшило количество эпилептических припадков у крыс [Goodrich et al., 2008].

На переживающих срезах гиппокампа крыс было показано, что амплитуда глутамат-вызванных ответов была ниже в срезах тех крыс, которым перед экспериментом вводили цефтриаксон. То есть цефтриаксон может модулировать активность глутаматных транспортеров, тем самым он оказывает и нейропротективный эффект замедляя распространение гипоксии [Lipski et al., 2007].

#### **2.4. ГАМКэргическая система и ее роль в эпилептогенезе**

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) – это основной тормозный нейромедиатор нервной системы млекопитающих. ГАМКергические нейроны широко представлены в разных отделах головного мозга, к ним относятся вставочные нейроны коры, нейроны гипоталамуса, клетки Пуркинье мозжечка и др. Основной функцией гамма-аминомасляной кислоты является осуществление процесса торможения в нервной системе. ГАМК также может оказывать на нейроны ноотропное воздействие и улучшать их функциональное состояние, за счет того, что данный медиатор включен в пути расщепления глюкозы в клетке [Карпова и др., 2015].

ГАМК синтезируется в мозге, путем декарбоксилирования глутамата ферментом глутаматдекарбоксилазой. Из синаптической щели ГАМК удаляется с помощью транспортеров, находящихся на пресинаптической мембране и на клетках глии. Далее данный нейромедиатор может превращаться обратно в глутаминовую кислоту с помощью фермента трансаминазы [Ben-Ari et al., 2007]. Тормозное действие ГАМК реализуется через рецепторы плазматической мембраны, представленные ионотропными ГАМК<sub>A</sub>- и метаботропными ГАМК<sub>B</sub>-рецепторами, связанными с G-белками [Николлс и др., 2003].



Изменения ГАМК-опосредованной синаптической передачи, в частности обусловленные нарушениями в работе ГАМК-рецепторов, способствуют развитию наследственной или приобретённой эпилепсии [Olsen and Avoli, 1997]. Нарушения ГАМКэргической системы подтверждаются исследованиями у пациентов и у экспериментальных животных с моделями эпилепсии. Такие антагонисты ГАМК, как пентилентетразол, бикикулин и пикртоксин широко используются при создании экспериментальных моделей эпилепсии для исследования антиконвульсантов [Брагина и др., 2010]. В хронических моделях эпилепсии показано снижение уровня ГАМК и количества ГАМКэргических аксонных терминалей в эпилептическом очаге [Карпова и др., 2015]. Эпилептогенным фактором также может быть гибель тормозных ГАМКэргических нейронов коры и гиппокампа [Зайцев А.В., 2016].

Гиперсинхронизация возбуждения в популяции нейронов, которая является причиной развития эпилептического состояния, может возникать из-за нарушений в ГАМК-рецептор-опосредованном тормозном сигнале [Chen et al., 2017].

#### **2.4.1 Ионотропные ГАМК-рецепторы**

ГАМК-рецептор относится к суперсемейству пентамерных лиганд-управляемых ионных каналов, содержащих цистеиновую петлю, к которому также принадлежат никотиновый ацетилхолиновый рецептор, глициновый и серотониновый рецепторы.

ГАМК-рецепторы селективно проницаемы для ионов хлора (и в некоторой степени для ионов бикарбоната) и обеспечивают быстрые реакции торможения за счет гиперполяризации мембраны и развития тормозного постсинаптического потенциала. [Hevers et al., 1998].

Структура ГАМК-рецептора включает 5 субъединиц, каждая из которых состоит из N-терминального внеклеточного домена, который содержит цистеиновую петлю, 4 гидрофобных мембранных доменов, представленных альфа-спиралью, и небольшого C-терминального внеклеточного домена. Второй трансмембранный домен всех субъединиц участвует в образовании поры ионного канала. Связывание ГАМК с сайтами связывания запускает серию конформационных изменений, приводящих к открытию ворот ионного канала [Nicholls et al., 2003]. Общей чертой семейства рецепторов, содержащих цистеиновую петлю, является расположение внеклеточного сайта связывания для лиганда между 2 субъединицами. Для наиболее распространённых изоформ ГАМК-рецепторов характерны 2 сайта связывания ГАМК. При этом канал может открыться при связывании ГАМК только с одним сайтом, но при связывании с 2 сайтами вероятность открытия канала значительно возрастает [Hervers and Luddens, 1998].

У человека субъединицы, входящие в состав рецептора закодированы в 19 генах, из которых 6 генов, кодируют изоформы  $\alpha$ -субъединицы, 3 –  $\beta$ , 3 –  $\gamma$ , 1 –  $\delta$ , 1 –  $\epsilon$ , 1 –  $\theta$ , 1 –  $\pi$  и 3 –  $\rho$ . Разнообразие генов, кодирующих субъединицы, а также наличие альтернативного сплайсинга и редактирования, опосредует вариабельность субъединичного состава, что приводит к появлению большого количества изоформ ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. При этом изоформы различаются не только структурно, но и функционально: субъединичный состав рецептора определяет кинетику ионного канала, аффинность рецептора к лиганду, возможность модуляции фармакологическими агентами [Карпова и др., 2015]. Сайты связывания для ГАМК находятся на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицах, с этими сайтами также могут связываться другие вещества, например, мусцимол и бикикуллин [Sieghart, 2015].

В экспериментах показано существование около 12 изоформ исследуемых рецепторов, более того процесс сборки рецептора не является случайным [Feng et al., 2017].

Субъединичный состав ГАМК<sub>A</sub>-рецептора может изменяться в различных отделах мозга, но большинство ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов ЦНС содержат две  $\alpha$ , две  $\beta$ , и одну  $\gamma 2$  субъединицу (рис.3). Наиболее распространенным изоформом, экспрессирующимся во всех отделах головного мозга, является  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  (более половины от всех ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов) [Chua et al., 2017].

В гиппокампе головного мозга человека преобладают рецепторы, содержащие  $\alpha 5$ -субъединицу, а также  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$  и  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$  изоформы, которые расположены в пирамидных клетках гиппокампа [Chen et al., 2017].

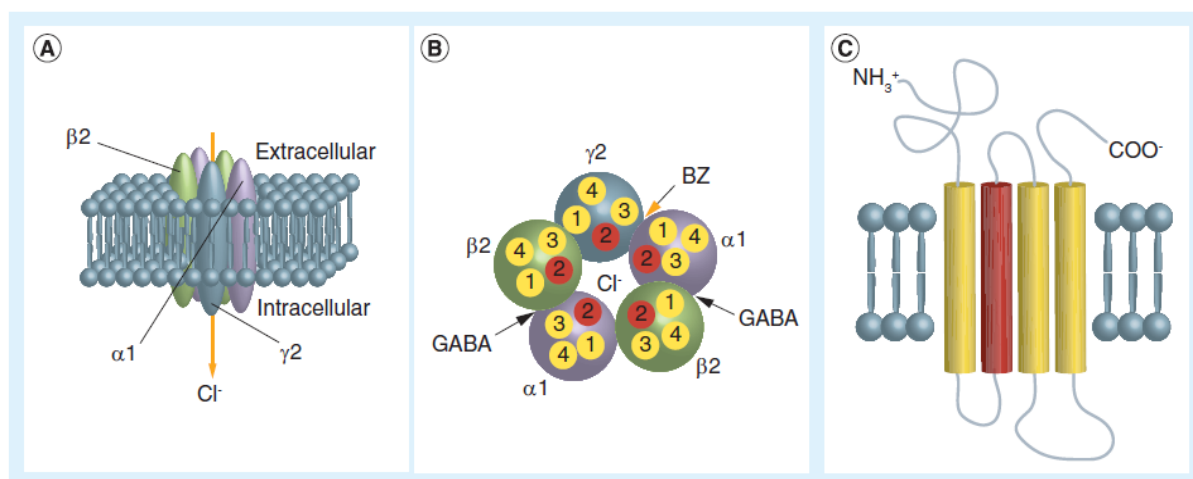


Рис.3. Структурная модель  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  ГАМК<sub>A</sub>-рецептора. А – 5 субъединиц рецептора образуют ионный канал. В – Взаимное расположение субъединиц, также показаны сайты связывания с ГАМК (GABA) и положительными аллостерическими модуляторами бензодиазепинами (BZ). С – Строение субъединицы рецептора, включающей 4 трансмембранных домена, второй трансмембранный домен участвует в образовании ионного канала (из Gong et al., 2015).

Разнообразие изотипов также может быть причиной различий в кинетике тормозных ГАМК-токов. Выделяют 2 типа ГАМКа-рецептор-опосредованного торможения: фазические токи, возникающее в ответ на быстрые выделения высоких концентраций ГАМК в синаптическую щель, опосредуется  $\alpha\beta\gamma$  ГАМКа рецепторами; а также тоническое торможение, вызванное  $\alpha\beta\delta$  ГАМКа рецепторами, активирующимися ГАМК, которая в малых концентрациях попадает в экstrasинаптическое пространство. Тоническое торможение играет важную роль для регуляции нейрональной возбудимости, например, в гиппокампе доля тонического торможения может достигать 90% от общего числа ГАМК-опосредованных токов [Feng et al., 2017].

Ионотропные ГАМКа-рецепторы являются мишенями для многих эндогенных и экзогенных модуляторов. На поверхности рецептора находится около 10 сайтов связывания для различных соединений, которые широко применяются в терапии у пациентов таких неврологических расстройств, как бессонница, депрессия и эпилепсия. [Sieghart, 2015]. К соединениям, способным модулировать ГАМКа-рецепторы относятся бензодиазепины, стероиды, барбитураты, анестетики, этанол и др. Впечатляющая структурная и функциональная гетерогенность ионотропных ГАМКа-рецепторов создает серьезные проблемы для изучения возможности их модуляции фармакологическими агентами. К настоящему моменту накоплены данные, показывающие взаимосвязь эффектов модуляторов ГАМКа-рецепторов и изотипов данных рецепторов, различающихся субъединичным составом, стехиометрией и расположением субъединиц рецептора друг относительно друга [Chua et al., 2017].

#### **2.4.2. ГАМКа-рецепторы в эпилептогенезе**

Ионотропные ГАМКа-рецепторы широко распространены в ЦНС и играют ключевую роль в тормозной синаптической передаче. ГАМКа-рецепторы могут находиться как в синаптической (пресинапс и постсинапс), так и во внесинаптической областях. Главными функциями ГАМКа-рецепторов в ЦНС считаются регуляция тревожности, процессов возбудимости, регуляция мышечного тонуса, обучения и памяти [Sieghart, 2015]. Дефекты ГАМКергической медиаторной системы вносят вклад в патогенез различных неврологических нарушений [Feng et al., 2017].

Чрезвычайно важная физиологическая роль ГАМКа-рецепторов имеет множество подтверждений. Мутации в генах, кодирующих данные рецепторы у мышей вызывают пороки развития, сенсомоторную дисфункцию, повышенную тревожность, эпилепсию, снижение продолжительности жизни. Нарушения в процессе встраивания рецепторов в мембрану у человека участвуют в таких расстройствах ЦНС как аутизм, шизофрения и ряд идиопатических эпилептических синдромов [Chua et al., 2017].

Модели височной эпилепсии у животных демонстрируют снижение экспрессии генов ГАМК-рецепторов в процессе эпилептогенеза. Предполагается, что состояние повышенной судорожной готовности вызывает изменения в экспрессии субъединиц ГАМКа-рецептора и перестройку рецепторов в мембранах клеток [Nishimura et al., 2005].

Антагонисты ГАМКа-рецепторов ингибируют тормозное действие ГАМК и могут индуцировать судорожные эффекты, как например пентилентетразол, используемый для создания модели эпилепсии. Ингибирование ГАМКа-рецепторов, приводящее к возникновению эпилептических судорог, может осуществляться различными путями. Во-первых, антагонисты могут конкурентно связываться с рецепторами (например, бикикулин), во-вторых, возможно ингибирование рецепторов при связывании антагонистов с аллостерическими сайтами, в-третьих, к ингибированию тормозной передачи может приводить блок хлорного канала (например, пикротоксин). В результате ингибирования тормозной ГАМК-опосредованной передачи наблюдается снижение гиперполяризации клеточной мембраны. Соответственно вещества, отрицательно влияющие на работу ионотропных ГАМКа-рецепторов, делятся на конкурентных антагонистов (бикукулин и габазин), негативных аллостерических модуляторов и неконкурентных блокаторов ионного канала ГАМКа-рецепторов [Gong et al., 2015].

#### **2.4.2. Эффект бета-лактамов антибиотиков на ионотропные ГАМКа-рецепторы**

При исследовании возможных мишеней цефалоспоринов – NMDA-рецепторов глутамата и ГАМКа-рецепторов было показано, что данные антибиотики связываются с ГАМКа-рецепторами, не взаимодействуя с NMDA-рецепторами [Sugimoto et al., 2003]. В тоже время имеются свидетельства влияния на ГАМКа-рецепторы и других групп бета-лактамов.

Ингибирование функции ГАМКа-рецепторов бета-лактамовыми антибиотиками приводит к гипервозбудимости нейронов за счет уменьшения эффективности торможения активности нейрона, что снижает порог судорожной готовности и повышает вероятность возникновения эпилептических симптомов. Введение агонистов ГАМКа-рецепторов таких как барбитураты и бензодиазепины, снижает эпилептиформную активность цефалоспоринов, что является доказательством данного механизма проэпилептического действия [Grill et al., 2011].

Несмотря на похожие эффекты проявления нейротоксичности различные семейства бета-лактамов имеют отличающиеся механизмы действия на ГАМКа-рецепторы [Kalueff, 2008]. Например, пенициллин G, прототип бета-лактамовых антибиотиков, считается неконкурентным антагонистом, который связывается с открытым каналом ГАМКа рецептора. Лиганд присоединяется к сайту связывания, находящемуся в открытом канале

и блокирует транспорт ионов через пору [Rossokhin et al., 2014]. Эпилептогенного воздействия пенициллина можно избежать, применяя пенициллиназу, фермент разрушающий бета-лактамное кольцо молекулы антибиотика.

Другие представители бета-лактамов, такие как имипинем (представитель карбапенемов) и цефотиам (цефалоспорин 3 поколения), конкурируют с ГАМК за сайт связывания на ГАМКа-рецепторе и не действуют непосредственно на ионный канал [Fujimoto et al., 1995].

Использование рекомбинантных субъединиц ГАМКа-рецептора и сайт-направленного мутагенеза подтверждает данные о разных механизмах индуцирования эпилептогенной активности. Замена тирозина на фенилаланин в 256 положении  $\beta 2$ -субъединицы ГАМКа-рецептора, в участке ионного канала, заметно снижает действие пенициллина G на ГАМК-ток, ингибирующее действие цефозелиса (цефалоспорина 1 поколения) на ГАМКа-рецепторы при этом не уменьшается. [Sugimoto et al., 2002]. Таким образом пенициллин G является неконкурентным блокатором ионного канала ГАМКа-рецептора, а цефалоспорины предполагаются конкурентными антагонистами.

Конкурентный механизм ингибирования ГАМКа-рецепторов подтверждается исследованиями с использованием меченых атомов. Цефазолин, цефалоридин, цефалексин существенно снижают способность синаптической мембраны головного мозга мыши специфически связывать  $^3\text{H}$ -ГАМК *in vitro* [Hori et al., 1985]. Некоторые цефалоспорины (цефазолин, цефозелис, цефотиам и др.) конкурентно дозозависимо вытесняют  $^3\text{H}$ -мусцимол, который является селективным агонистом ГАМК. Эти результаты позволяют предположить, что цефалоспорины главным образом взаимодействуют с сайтами связывания ГАМК у рецепторов, содержащих  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  субъединицы. Но представляется вероятным существование и других сайтов связывания на ГАМКа-рецепторах [Sugimoto et al., 2003].

### **3. Материалы и методы исследования**

#### **3.1 Животные и подготовка объекта исследования**

Исследование проводилось на крысах линии Вистар в возрасте 21 день, в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными, действующими в ИФЭБ РАН и соответствующими Российскому и международному законодательству.

Крысы подвергались декапитации, головной мозг быстро извлекался и помещался в искусственную спинномозговую жидкость (ИСЖ), аэрируемую карбогеном (95%O<sub>2</sub> и 5%CO<sub>2</sub>). ИСЖ имела состав (мМ): 1.0 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 2.5 KCl, 10 глюкозы, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 126 NaCl; pH 7.3–7.4, температура раствора составляла около 0°C. Далее производилось изготовление горизонтальных срезов мозга, содержащих энторинальную кору и гиппокамп, толщиной 350 мкм на вибрирующем микротоме Microm HM650V (Microm; Germany). Затем срезы инкубировали 60 минут в аэрируемой ИСЖ при комнатной температуре.

В зависимости от решаемой задачи далее производилась либо изоляция нейронов глубоких слоев энторинальной коры, либо экспериментальная работа продолжалась с изготовленными срезами.

#### **3.2. Изоляция пирамидных нейронов**

Для изоляции пирамидных нейронов использовалась методика, описанная ранее [Kay et al., 1986; Kaneda et al., 1988; Malkin et al., 2016]. Выделение из среза отдельных нейронов производилось с помощью сочетания ферментативной и механической обработки.

Из ИСЖ срезы переносили в раствор для изолированных клеток, имеющий следующий состав (в мМ): 1.6 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, 2.0 KCl, 10 глюкозы, 10 HEPES, 145 NaCl; pH раствора доводился до значения 7.4 путем добавления NaOH. Раствор аэрировался 100% кислородом.

Для ферментативной обработки в раствор добавляли протеазу *Streptomyces griseus* в концентрации 1 мг на 1 мл раствора, затем емкость со срезами помещали в термостат и выдерживали 35 минут при температуре 35°C. После воздействия протеазы срезы отмывали чистым раствором и переносили в чашку Петри (диаметр 35 мм), где с помощью скальпеля отделяли необходимые участки энторинальной коры. Изоляция нейронов достигалась за счет пипетирования выделенных фрагментов срезов несколькими пипетками Пастера разного диаметра, от большего диаметра к меньшему. В работе использовались чашки Петри (Nunc) с покрытием, обеспечивающим адгезию клеток ко дну. Затем клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для достижения лучшего прикрепления к дну чашки.

### 3.3. Регистрация постсинаптических токов в переживающих срезах

Экспериментальная установка для работы с переживающими срезами включает перфузируемую камеру, с термостатом, микроскоп Zeiss Axioscop 2 (Zeiss; Германия), оснащенный дифференциальной интерференционной контрастной оптикой, видеокамеру (Grasshopper 3 GS3-U3-23S6M-C, FLIR Integrated Imaging Solutions Inc., США) и микроманипуляторы.

Электроды изготавливали из боросиликатного стекла с помощью пуллера P-1000 (Sutter Instrument; Novato, CA, USA), затем их заполняли раствором, содержащим (в mM): 127  $\text{CH}_3\text{CsO}_3\text{S}$ , 10 NaCl, 5.0 EGTA, 10 HEPES, 6.0 QX314, 4.0 ATP-Mg и 0.3 GTP; pH доводили до значения 7.25 добавлением CsOH. Сопротивление заполненного раствором электрода составляло 3 – 5 МОм. Для регистрации использовался пэтч-кламп усилитель модели 2400 (AM-Systems; USA) и аналого-цифровой преобразователь NI USB-6343 A/D (National Instruments, USA), а также применялось программное обеспечение WinWCP 5 (SIPBS, UK).

Данные отфильтровывали на частоте 10 кГц и отображали на частоте 20 кГц. Во всех включенных в эксперимент клетках после достижения конфигурации «целая клетка», входное сопротивление составляло менее 15 МОм и оставалось стабильным ( $\leq 20\%$  увеличение) в течение эксперимента.

ГАМКа-рецептор-опосредованные синаптические токи записывались в присутствии селективных антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов DNQX (10 мкМ) и МК-801 (10 мкМ). Цефалоспорины добавляли в перфузирующий раствор, в различных концентрациях (в mM): 0.5, 1, 2, 4, 8. В каждом срезе проверяли только одну концентрацию антибиотика.

Синаптические ответы вызывали экстраклеточной стимуляцией. Стимулирующий биполярный электрод устанавливали в тот же слой энторинальной коры, где и производилась регистрация на расстоянии 100-200 мкм от регистрируемой клетки.

Экспериментальный протокол включал в себя запись около 50 вызванных тормозных постсинаптических токов (вТПСТ) от каждой клетки. В целях исключения возможности каких-либо пластических эффектов в тормозных синапсах, экстраклеточный стимул подавался 1 раз в 30 секунд. Первые 15 ответов регистрировались для того, чтобы установить базовую амплитуду ответа, затем в перфузирующий раствор добавлялся цефепим или цефтриаксон.

### 3.4. Регистрация ответов изолированных нейронов на аппликации ГАМК в присутствии цефалоспоринов

Экспериментальная установка для работы с изолированными клетками оснащена инвертированным микроскопом, микроманипулятором и системой быстрых аппликаций реактивов HSSE-2/3 (ALA Scientific Instruments Inc., USA).

Чашку Петри с осевшими на дно нейронами помещали в экспериментальную установку, эксперимент проводился с постоянной перфузией раствором, аэрируемым 100% кислородом.

В исследовании использовались нейроны, которые имели правильную пирамидную форму и хорошо сохранившиеся отростки (рис.4).

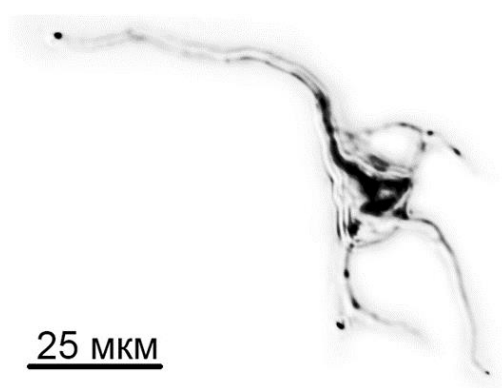


Рис.4. Микрофотография изолированного пирамидного нейрона коры головного мозга крысы

Для эксперимента изготавливали электроды из боросиликатного стекла с помощью пуллера P-1000 (Sutter Instrument; Novato, CA, USA). Электроды заполнялись раствором, содержащим (в мМ): 127 CsF, 10 NaCl, 5.0 EGTA, 6.0 QX314, 10 HEPES, 4.0 ATP-Na, 0.1 GTP-Na; pH доводился до значения 7.25 путем добавления CsOH. Сопротивление заполненного электрода составляло 3 – 5 МОм. Данный пипеточный раствор обеспечивает высокое входное сопротивление мембраны нейрона и возможность продолжительной записи ГАМК-токов.

К выбранной клетке подводили электрод, добиваясь плотного контакта между кончиком электрода и клеточной мембраной и возрастания сопротивления до  $\geq 10^9$  Ом (гигаомный контакт). Затем с помощью дополнительного присасывания и создания в электроде отрицательного давления, участок мембраны, находящийся в месте контакта, прорывался, тем самым объединяя содержимое электрода и цитоплазмы клетки.

После достижения конфигурации “целая клетка” мембранный потенциал фиксировали при значении -27 мВ, что обеспечивает, во-первых, более продолжительную регистрацию



при использовании Cs-содержащего раствора, во-вторых, положительные значения токов, вызванных аппликацией ГАМК. Для выполнения поставленных задач на нейрон производились быстрые аппликации ГАМК (конструкция системы аппликации позволяет осуществлять смену подающегося на клетку раствора за  $\approx 5$  мс) как в контрольных условиях, так и в присутствии исследуемых цефалоспоринов. Длительность аппликации составляла 250 – 500 мс (более длительные аппликации применялись для меньших концентраций ГАМК).

Для оценки эффективности ингибирования антибиотиками использовались следующие концентрации ГАМК (в мкМ): 3.2, 10, 32, 100, 320. Апплицируемая ГАМК разводилась в растворе для изолированных клеток. На один нейрон апплицировалась ГАМК только в одной концентрации. В эксперименте использовался протокол, включающий регистрацию контрольного ответа на ГАМК, затем ответа на ГАМК в присутствии цефалоспорины и ответа после отмыва антибиотика.

Регистрация ГАМК-токов производилась с использованием пэтч-кламп усилителя модели 2400 (AM-Systems, USA) и аналого-цифрового преобразователя NI USB-6211 A/D (National Instruments, USA), программное обеспечение – WinWCP 5 (SIPBS, UK).

Данные отфильтровали на частоте 10 кГц и отобрали на частоте 20 кГц.

### 3.5. Обработка экспериментальных данных

Относительный блок цефалоспоринов ГАМК-рецептор-опосредованного тока рассчитывали по формуле:

$$\text{Block} = 100\% \times \frac{A_{\text{baseline}} - A_{\text{cephalosporin}}}{A_{\text{baseline}}} \quad (1),$$

где  $A_{\text{baseline}}$  и  $A_{\text{cephalosporin}}$  – либо средние амплитуды вызванных постсинаптических токов до и через 10 минут после добавления антибиотика в раствор, соответственно, либо амплитуды ответов на аппликацию ГАМК в контрольном растворе и в растворе с добавлением цефалоспоринов, соответственно.

Для оценки эффективности блокирования исследуемыми цефалоспориновыми антибиотиками ГАМК-опосредованной синаптической передачи использовалось значение концентрации полумаксимального ингибирования ответа (IC<sub>50</sub>), которое определялось из аппроксимации полученных кривых ингибирования следующей функцией:

$$\text{Block}(C) = 100\% \times \frac{C^n}{IC_{50}^n + C^n} \quad (2),$$

Где  $C$  – это концентрация цефалоспорины,  $n$  – коэффициент Хилла,  $IC_{50}$  – концентрация полумаксимального ингибирования.

Чтобы оценить влияние цефалоспоринов на кинетику вызванного тормозного постсинаптического тока, производился анализ его спада (ограниченного от 90% до 10% от пиковой амплитуды) с помощью двухэкспоненциальной функции:

$$I(t; A_{fast}, \tau_{fast}, A_{slow}, \tau_{slow}) = A_{fast} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{fast}}\right) + A_{slow} * \exp\left(-\frac{t}{\tau_{slow}}\right) \quad (3),$$

где  $A_{fast}$  и  $A_{slow}$  – амплитуды быстрого и медленного компонентов спада, а  $\tau_{fast}$  и  $\tau_{slow}$  – временные константы быстрого и медленного компонентов спада соответственно.

Взвешенная временная константа, для оценки влияния цефалоспоринов на временные характеристики спада, рассчитывалась по формуле:

$$\tau_{weighted} = \frac{\tau_{fast} * A_{fast} + \tau_{slow} * A_{slow}}{A_{fast} + A_{slow}} \quad (4).$$

### 3.6. Статистическая обработка

Для анализа данных использовалось программное обеспечение Wolfram Mathematica 10 (Wolfram Research, USA). Статистическая обработка, а также построение графиков проводились с использованием SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, USA). Нормальность выборки оценивалась с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Для оценки значимости различий в случае выборок с нормальным распределением использовался Т-критерий Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), в случае ненормального распределения использовался тест Краскела-Уоллиса. Статистическая значимость различий принималась при  $p < 0.05$ . Результаты выражены в виде среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## 4. Результаты и обсуждения

### 4.1. Цефалоспорины блокируют вызванные экстраклеточной стимуляцией тормозные постсинаптические токи (вТПСТ)

Для оценки способности цефалоспоринов блокировать тормозную синаптическую передачу производилась запись постсинаптических токов, вызванных экстраклеточной стимуляцией, в пирамидных нейронах медиальной энторинальной коры головного мозга крысы. Регистрация осуществлялась в условиях блокады возбуждающей синаптической передачи (DNQX, 10 мкМ; MK-801, 10 мкМ).

Добавление антибиотика приводило к снижению амплитуды вТПСТ (рис.5А). Был рассчитан относительный блок амплитуды вызванного тормозного постсинаптического тока цефепимом и цефтриаксоном в разной концентрации (по формуле 1). По результатам серии эксперименты построены зависимости силы ингибирования от концентраций антибиотиков (рис.5Б). Построенные кривые показывают, что для эффективного блокирования тормозной синаптической передачи требуются миллимолярные концентрации исследуемых цефалоспоринов. Полученные зависимости аппроксимировались уравнением Хилла (формула 2), что позволило оценить концентрации полумаксимального ингибирования ответа ( $IC_{50}$ ). Рассчитанные  $IC_{50}$  составили  $2.0 \pm 0.1$  мМ и  $1.6 \pm 0.1$  мМ для цефтриаксона и цефепима, соответственно.

Таким образом цефепим является более сильным блокатором ГАМК-токов по сравнению с цефтриаксоном, что подтверждается многочисленными сообщениями о появлении судорожного синдрома после приема данного антибиотика [Appa et al., 2017].

Мы показали, что для эффективного блокирования тормозной ГАМК-опосредованной синаптической передачи требуются миллимолярные концентрации антибиотиков. Тем не менее данные о прохождении цефепима через гематоэнцефалический барьер у пациентов в ходе терапии демонстрируют судорожное состояние, возникающее при микромолярных концентрациях. Концентрация цефепима в сыворотке крови, необходимая для возникновения эпилептических симптомов оценивается от 20 до 35 мг/л (концентрация цефепима 35 мг/л равна 60  $\mu$ М) [Payne et al., 2017]. Количество цефепима в спинномозговой жидкости пациентов с индуцированными антибиотиком судорогами составляет около 13 мг/л или 23  $\mu$ М [Durand-Maugard et al., 2012]. Разница между оцененной нами концентрацией полумаксимального ингибирования для цефепима ( $1.6 \pm 0.1$  мМ) и достигаемой в спинномозговой жидкости концентрации данного антибиотика (23  $\mu$ М) в ходе терапии составляет почти два порядка.

У крыс также показано развитие судорожного состояния при применении микромолярных концентраций цефтриаксона [De Sarro et al., 1995]. Концентрация

цефозелиса (цефалоспорины IV поколения) в спинномозговой жидкости крыс, необходимая для развития судорожного состояния, составляет в среднем 43,1 мкг/мл или 69 мМ [Nagata and Yasuhara, 2001]. Цефепим и цефозелис структурно сходны, что позволяет предположить, что их концентрации, приводящие к возникновению судорог также не будут иметь сильных различий.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что непосредственное ингибирование ГАМК-рецепторов не является основным механизмом возникновения судорожных состояний в ходе терапии данными антибиотиками.

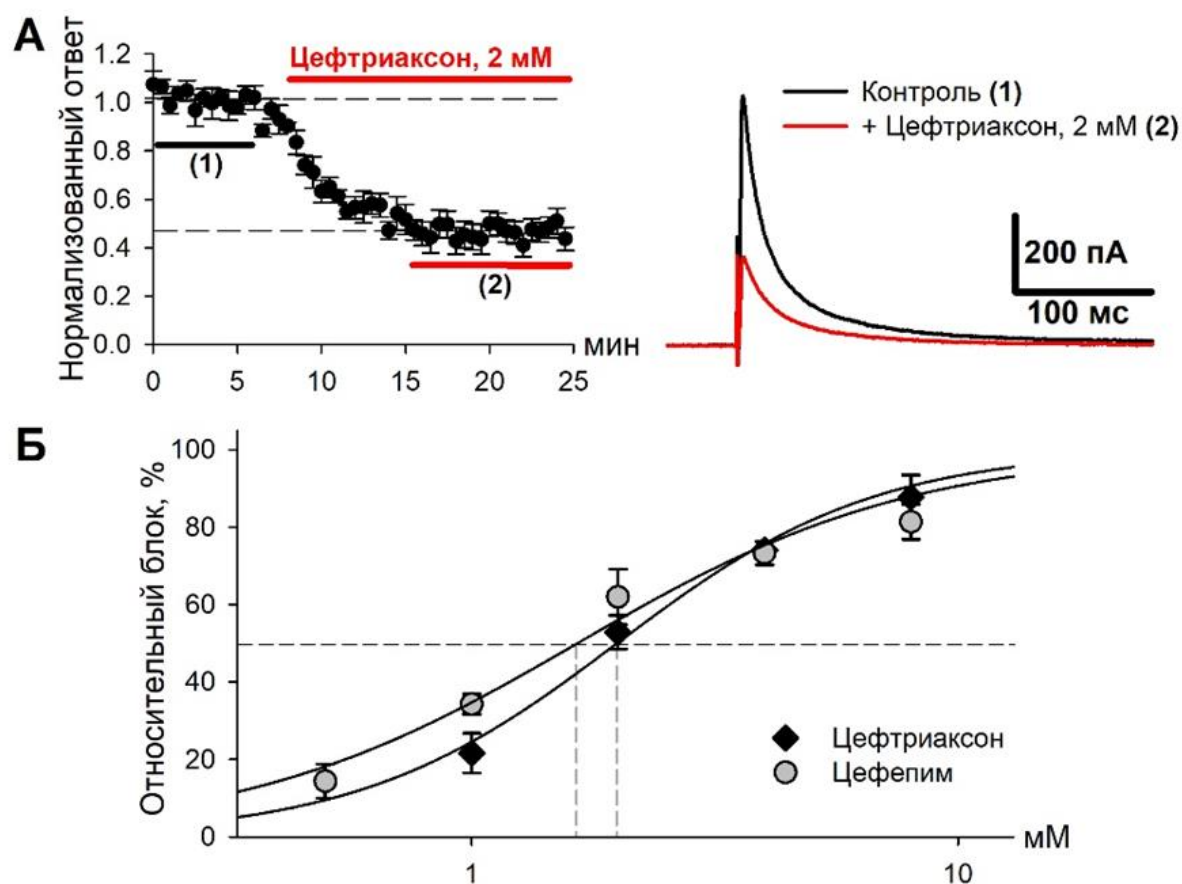


Рис.5. Цефалоспорины блокируют тормозную синаптическую передачу в срезах энторинальной коры. А – Экспериментальный протокол, применявшийся для оценки влияния цефалоспоринов на ГАМК-опосредованную синаптическую передачу. Первые 15 вызванных тормозных постсинаптических токов записывались в стандартном перфузирующем растворе, затем в раствор добавляли антибиотик (в данном примере – цефтриаксон). Всего записывались 50 вызванных постсинаптических токов, стимул подавался 1 раз в 30 секунд. Справа изображены примеры вызванных токов в контрольном растворе и в растворе с добавлением цефтриаксона. Б – Полученные кривые доза-эффект для цефтриаксона и цефепима. Каждой точке соответствуют 5-10 проведенных измерений.

#### 4.2. Цефепим и цефтриаксон по-разному влияют на кинетику спада вызванного тормозного постсинаптического тока.

Даже небольшие изменения временного течения ГАМК-опосредованного тока могут существенно сказываться на эффективности процесса синаптического торможения [Lu et al., 2008]. Кроме влияния на амплитуду ответа, была проанализирована кинетика спада вызванных постсинаптических токов. Спад тока (90% - 10% от пика) был аппроксимирован двухэкспоненциальной функцией (формула 3), как описано в разделе Материалы и методы. При анализе оценивались быстрая и медленная временные константы, а также взвешенная временная константа (рис.6)

Цефтриаксон не оказал значимого влияния на временные константы спада (исходный ответ:  $\tau_{fast} = 19 \pm 4$  мс,  $\tau_{slow} = 109 \pm 11$  мс; в присутствии цефтриаксона:  $\tau_{fast} = 19 \pm 4$  мс, парный Т-тест,  $P = 0.92$ ;  $\tau_{slow} = 111 \pm 13$  мс,  $P = 0.59$ ;  $n=7$ ).

Цефепим существенно изменил временные константы (исходный ответ:  $\tau_{fast} = 16 \pm 2$  мс,  $\tau_{slow} = 88 \pm 11$  мс; в присутствии цефепима:  $\tau_{fast} = 20 \pm 2$  мс, парный Т-тест,  $P = 0.03$ ;  $\tau_{slow} = 257 \pm 63$  мс,  $P = 0.013$ ;  $n=10$ ).

Цефтриаксон также не изменил взвешенную временную константу (контроль:  $\tau_{weighted} = 67 \pm 12$  мс; в присутствии цефтриаксона:  $\tau_{weighted} = 71 \pm 12$  мс, парный Т-тест,  $P = 0.38$ ,  $n=7$ ). Цефепим значительно увеличил взвешенную временную константу (контроль:  $\tau_{weighted} = 55 \pm 9$  мс; в присутствии цефепима:  $\tau_{weighted} = 118 \pm 33$  мс, парный Т-тест,  $P=0.03$ ,  $n=10$ ).

Цефепим значительно влияет на различные компоненты вТПСТ и может способствовать появлению медленных временных компонентов спада. Цефтриаксон, в свою очередь, одинаково блокирует как быстрые, так и медленные компоненты ответа.

Ранее сообщалось, что конкурентные антагонисты могут увеличивать относительный вклад высокоаффинных ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов в синаптический ответ [Wall, 2003], а также влиять на кинетику десенситизации ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [Xu et al., 2016]. Оба этих фактора потенциально могут оказать влияние на кинетику спада вТПСТ. Также докладывалось, что неконкурентный антагонист ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пикротоксин ускоряет кинетику вТПСТ [Korshoej et al., 2010], то есть оказывает противоположный эффект, по сравнению с цефепимом. Таким образом, полученные различия эффектов двух разных представителей цефалоспоринов на кинетику спада вТПСТ позволил нам предположить, что они могут иметь различный механизм ингибирования ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Данное предположение было проверено с помощью экспериментов на изолированных нейронах.

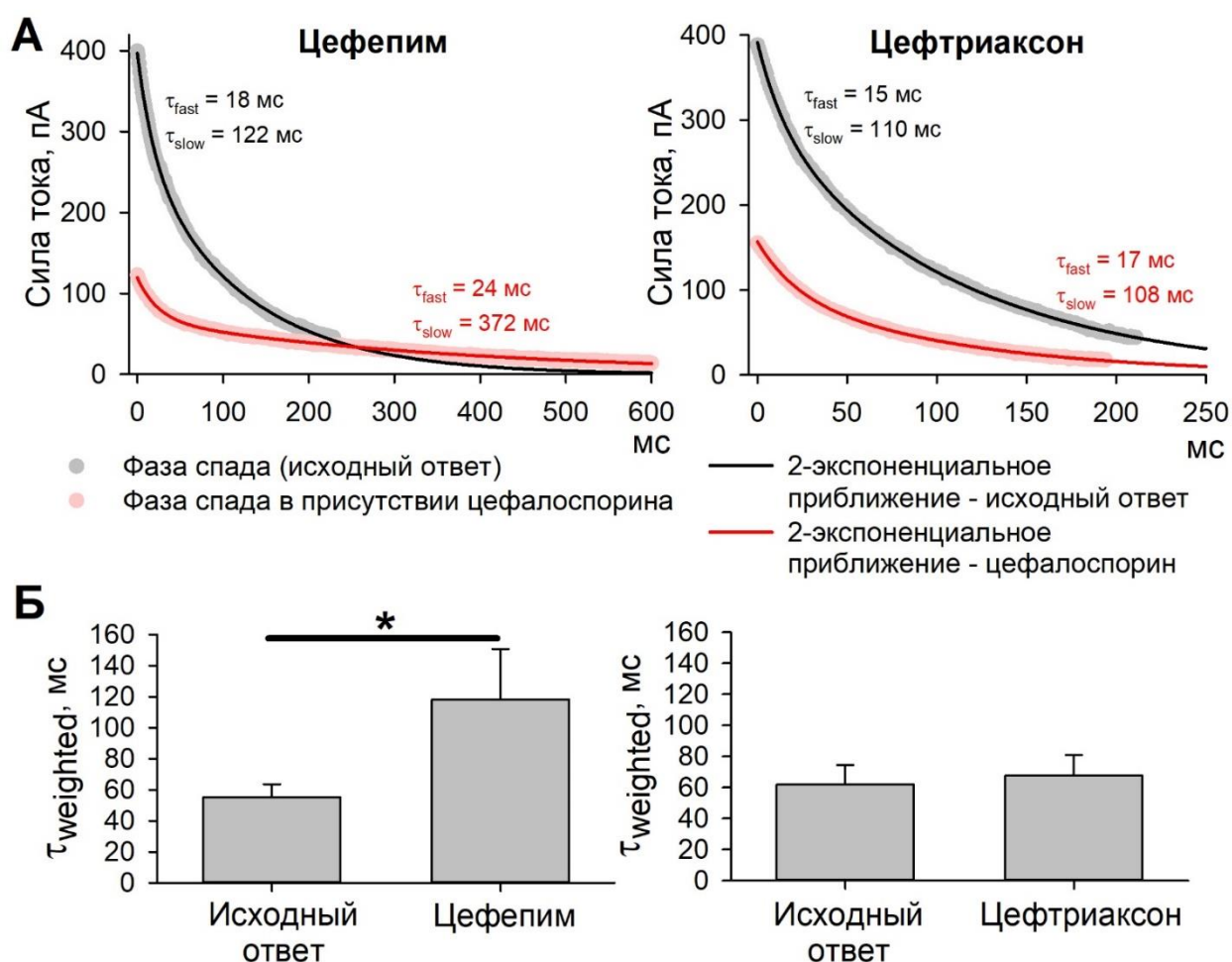


Рис.6. Цефепим и цефтриаксон оказывают различное влияние на кинетику спада вызванных тормозных постсинаптических токов. А – Анализировалась фаза спада, ограниченная от 90 % до 10%. Цефепим (слева) существенно изменяет временные константы спада, в то время как цефтриаксон (справа) не оказывает на них существенного влияния. Б – Цефепим увеличивает взвешенную временную константу, а цефтриаксон на нее не влияет.

#### 4.3. Оценка эффективности блока ответа на аппликацию ГАМК цефалоспоридами

Для того, чтобы оценить эффективность блока ГАМК-рецепторов цефалоспоридами и выяснить механизм ингибирования производились быстрые аппликации ГАМК на изолированные нейроны энторинальной коры. Сначала записывался контрольный ответ на ГАМК, затем ответ в присутствии цефалоспорида и ответ после отмыва от антибиотика (рис.7А). Для того, чтобы сравнить механизмы ингибирования цефепима и цефтриаксона использовались различные концентрации ГАМК (в мкМ): 3.2, 10, 32, 100, 320, концентрация антибиотика составляла 2.5 мМ.

Исследуемые антибиотики обратимо блокируют ответы ГАМК-рецепторов. Сила блока ГАМК-вызванного тока цефепимом зависит от концентрации апплицируемой ГАМК, (тест Краскела-Уоллиса,  $P < 0.001$ , проведено попарное сравнение по методу Данна). Наибольшая сила блока наблюдается при наименьшей концентрации гамма-аминомасляной кислоты и затем сила блока спадает при увеличении концентрации ГАМК (рис.7Б). Это свидетельствует о том, что цефепим является конкурентным ингибитором ионотропных ГАМК-рецепторов. Полученные данные подтверждают результаты предыдущих исследований [Sugimoto et al., 2003], в котором продемонстрирован конкурентный механизм ингибирования для цефепима и ряда других цефалоспоринов.

Несмотря на сообщения о двойственном про- и антиэпилептическом эффекте цефтриаксона на ЦНС, его влияние на ГАМК-рецепторы ранее не исследовалось. Сила блока ГАМК-опосредованного ионного тока цефтриаксоном достоверно не различается при аппликации разных концентраций ГАМК (one-way ANOVA,  $F_{3, 20} = 1.436$ ,  $P = 0.267$ ). Таким образом, наши результаты демонстрируют неконкурентный механизм ингибирования ГАМК-рецепторов цефтриаксоном, отличающийся от других ранее исследованных представителей цефалоспориновых антибиотиков.

В недавнем исследовании была продемонстрирована взаимосвязь между структурой цефалоспоринового антибиотика и возможностью его нейротоксического эффекта. Цефалоспорины с положительно заряженной группой в составе C-3 боковой цепи сильнее блокируют лиганд-рецепторные взаимодействия [Han et al., 2018]. Обнаруженные нами различия в механизмах связывания цефепима и цефтриаксона с ГАМК-рецепторами возможно обусловлены разным строением боковой C-3 цепи и наличием у цефепима положительно заряженного четвертичного амина.



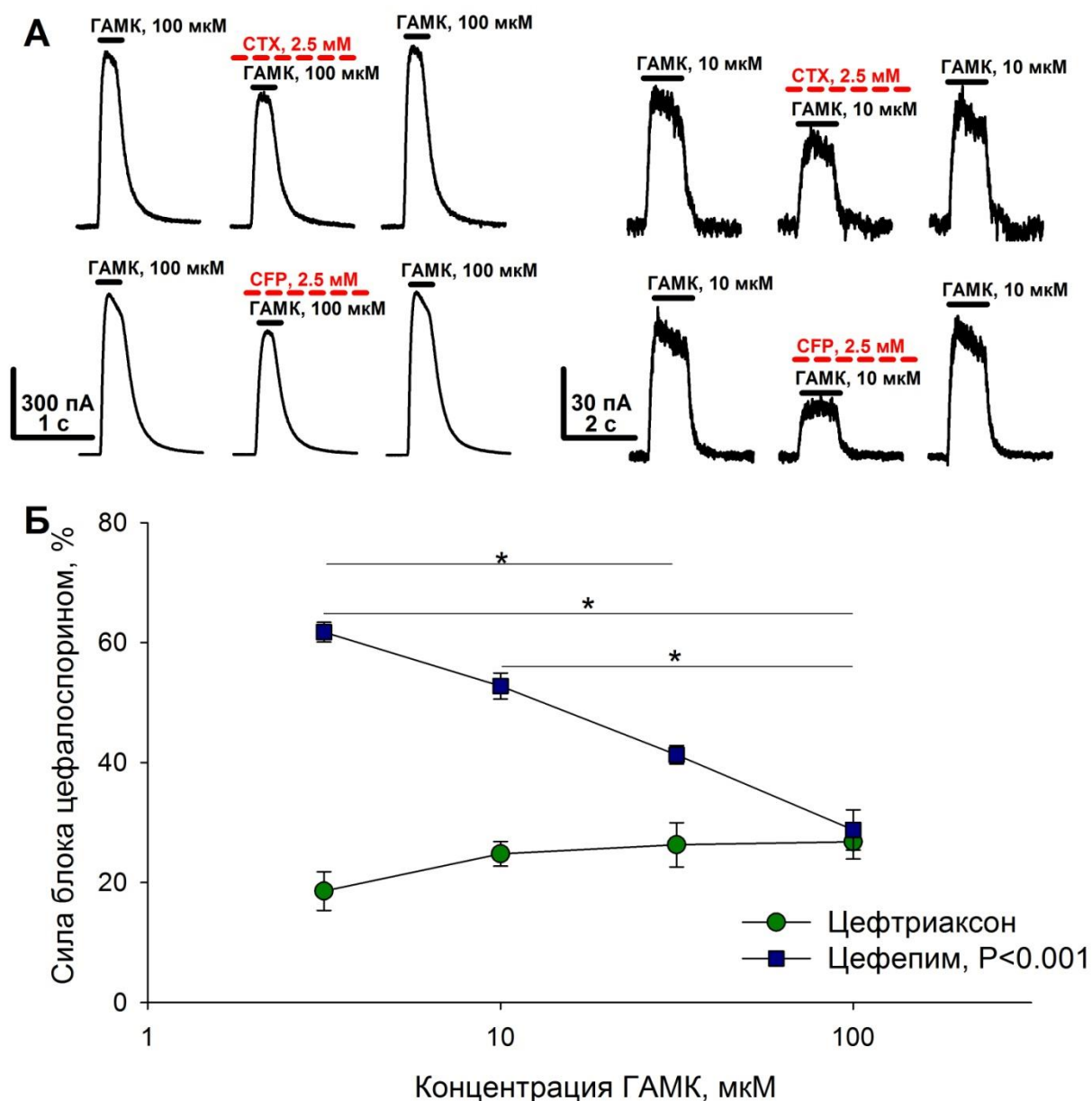


Рис.7. Цефепим и цефалоспорин обратимо блокируют ГАМК-вызванные токи в изолированных нейронах. А – Примеры ответов изолированных нейронов на ГАМК в концентрации 10 и 100 мкМ в присутствии цефтриаксона или цефепима. Сначала регистрировался контрольный ответ, затем ответ после добавления антибиотика, затем ответ после отмыва. Б – Относительный блок ГАМК-вызванного тока цефалоспоридами. Цефепим блокирует ответ на аппликацию ГАМК зависимо от концентрации ГАМК, а цефтриаксон независимо.

## 5. Выводы

1. Цефалоспорины эффективно блокируют вызванные тормозные постсинаптические токи в миллимолярных концентрациях (оцененные концентрации полумаксимального ингибирования составили  $2.0 \pm 0.1$  мМ для цефтриаксона и  $1.6 \pm 0.1$  мМ для цефепима).
2. Цефепим и цефтриаксон по-разному влияют на кинетику спада вТПСТ: цефепим, в отличие от цефтриаксона, значительно замедляет инактивацию тока.
3. Разные представители цефалоспоринов могут иметь отличающиеся механизмы ингибирования ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов. Цефепим является конкурентным антагонистом, а цефтриаксон неконкурентным.

## 6. Список литературы

1. Брагина Т.А., Иванов И.М., Головкин А.И., Иванов М.Б. Обоснование возможности использования блокаторов хлор-ионного канала ГАМК-рецепторов для моделирования височной эпилепсии. *Успехи физиологических наук*. Т. 41. № 2. С. 44-50 (2010).
2. Неврология : национальное руководство / под ред. Е.И. Гусева, А.Н. Коновалова, В.И. Скворцовой, А.Б. Гехт. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009, 1040 с.
3. Зайцев А.В. Роль ГАМКергических интернейронов коры и гиппокампа при развитии эпилепсии. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. Т. 102. № 5. С. 513-528 (2016).
4. Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю. ГАМК и ее рецепторы в патогенезе эпилепсии. 2015. *Успехи физиологических наук*. Т. 46. № 3. С. 46-59 (2015).
5. Матухно А.Е., Сухов А.Г., Кирой В.Н. ГАМКергическая рецепторная система и ее роль в системной деятельности мозга. *Успехи физиологических наук*. Т. 45. № 3. С. 79-96 (2014).
6. Мостовой Ю.М. Цефалоспорины: разочарования и оптимизм. *Медицина сегодня*. 19 (391) (2011).
7. Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. М.: УРСС, 2003, 677 с.
8. Петров А.Н., Войцехович К.О., Мелехова А.С., Лисицкий Д.С., Бельская А.В., Михайлова М.В., Гайкова О.Н. Проблемы диагностики нейротоксических нарушений – последствий отравлений веществами судорожного действия. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. № 3 (59). С. 211-217 (2017).
9. Савенкова М.С. Цефалоспорины: история вопроса, классификация, показания к применению парентеральных и пероральных форм. *Consilium Medicum. Педиатрия*. (Прил.) 4: 56-60 (2012).
10. Селизарова Н.О. Антибиотики бета-лактамной структуры (Проблемы химиотерапии от П.Эрлиха до наших дней). *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. Т. 1. № 1. С. 56-65 (2002).
11. Alexander, S. P.H., Peters, John A., Kelly, E., Marrion, N.V., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Ligand-gated ion channels. *Br. J. Pharmacol.* **174**, S130–S159 (2017).
12. Amakhin, D. V., Soboleva, E. B. & Zaitsev, A. V. Cephalosporin antibiotics are weak blockers of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated synaptic transmission in rat brain slices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1–7 (2018).

13. Anzellotti, F., Ricciardi, L., Monaco, D., Ciccocioppo, F., Borrelli, I., Zhuzhuni, H., Onofri, M. Cefixime-induced nonconvulsive status epilepticus. *Neurol. Sci.* **33**, 325–329 (2012).
14. Appa, A. A., Jain, R., Rakita, R. M., Hakimian, S. & Pottinger, P. S. Characterizing Cefepime Neurotoxicity: A Systematic Review. *Open Forum Infect. Dis.* **4**, 2–6 (2017).
15. Bajrektarevic, D. & Nistri, A. Ceftriaxone-mediated upregulation of the glutamate transporter GLT-1 contrasts neurotoxicity evoked by kainate in rat organotypic spinal cord cultures. *Neurotoxicology* **60**, 34–41 (2017).
16. Bazan, J. A., Martin, S. I. & Kaye, K. M. Newer Beta-lactam Antibiotics: Doripenem, Ceftobiprole, Ceftaroline, and Cefepime. *Med. Clin. North Am.* **95**, 743–760 (2011).
17. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R. & Khazipov, R. GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiol. Rev.* **87**, 1215–1284 (2007).
18. Bhattacharyya, S., Darby, R. & Berkowitz, A. L. Antibiotic-Induced Neurotoxicity. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **16**, 1–6 (2014).
19. Chang, Y. M. Cefepime-induced nonconvulsive status epilepticus as a cause of confusion in an elderly patient. *J. Formos. Med. Assoc.* **114**, 290–291 (2015).
20. Chen, X., Durisic, N., Lynch, J. W. & Keramidas, A. Inhibitory synapse deficits caused by familial  $\alpha 1$  GABA<sub>A</sub> receptor mutations in epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **108**, 213–224 (2017).
21. Chen, X., Keramidas, A. & Lynch, J. W. Physiological and pharmacological properties of inhibitory postsynaptic currents mediated by  $\alpha 5\beta 1\gamma 2$ ,  $\alpha 5\beta 2\gamma 2$  and  $\alpha 5\beta 3\gamma 2$  GABA<sub>A</sub> receptors. *Neuropharmacology* **125**, 243–253 (2017).
22. Chow, K. M., Szeto, C. C., Hui Andrew, A. C. F., Wong, T. Y. H. & Li, P. K. T. Retrospective review of neurotoxicity induced by cefepime and ceftazidime. *Pharmacotherapy* **23**, 369–373 (2003).
23. Chua, H. C. & Chebib, M. GABA<sub>A</sub> Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. *Adv. Pharmacol.* **79**, 1–34 (2017).
24. Cock, H. R. Drug-induced status epilepticus. *Epilepsy Behav.* **49**, 76–82 (2015).
25. Dakdouki, G. K. & Al-War, G. N. Cefepime-induced encephalopathy. *Int. J. Infect. Dis.* **8**, 59–61 (2004).
26. Demir, A. B., Bora, I. & Uzun, P. Nonconvulsive status epilepticus cases arising in connection with cephalosporins. *Epilepsy Behav. Case Reports* **6**, 23–27 (2016).
27. Dienel, G. A., Behar, K. L. & Rothman, D. L. Cellular Origin of [<sup>18</sup>F]FDG-PET Imaging Signals During Ceftriaxone-Stimulated Glutamate Uptake: Astrocytes and Neurons. *Neurosci.* 107385841774937 (2017).

28. Durand-Maugard, C., Lemaire-Hurtel, A. S., Gras-Champel, V., Hary, L., Maizel, J., Prud'homme-Bernardy, A., Andréjak, C., Andréjak, M. Blood and CSF monitoring of cefepime-induced neurotoxicity: Nine case reports. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1297–1299 (2012).
29. Feng, H. J. & Forman, S. A. Comparison of  $\alpha\beta\delta$  and  $\alpha\beta\gamma$  GABA receptors: Allosteric modulation and identification of subunit arrangement by site-selective general anesthetics. *Pharmacol. Res.* (2018).
30. Fisher, R. S. & Bonner, A. M. The Revised Definition and Classification of Epilepsy for Neurodiagnostic Technologists. *Neurodiagn. J.* **58**, 1–10 (2018).
31. Fujimoto, M., Munakata, M. & Akaike, N. Dual mechanisms of GABA response inhibition by beta-lactam antibiotics in the pyramidal neurones of the rat cerebral cortex. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 3014–3020 (1995).
32. Gong, P., Hong, H. & Perkins, E. J. Ionotropic GABA receptor antagonism-induced adverse outcome pathways for potential neurotoxicity biomarkers. *Biomark. Med.* **9**, 1225–1239 (2015).
33. Goodrich, G. S. et al. Ceftriaxone treatment after traumatic brain injury restores expression of the glutamate transporter GLT-1, reduces regional gliosis, and reduces posttraumatic seizures in the rat. *Antioxid. Redox Signal.* 090716, 1–50 (2012).
34. Griffith, C. A. & Hoffmann, D. E. Status epilepticus attributed to inadvertent intrathecal injection of cefazolin during myelography. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **23**, 631–636 (2013).
35. Grill, M. F. & Maganti, R. K. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: Management considerations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **72**, 381–393 (2011).
36. Grill, M. F. & Maganti, R. Cephalosporin-induced neurotoxicity: Clinical manifestations, potential pathogenic mechanisms, and the role of electroencephalographs monitoring. *Ann. Pharmacother.* **42**, 1843–1850 (2008).
37. Hagiya, H., Miyawaki, K., Yamamoto, N., Yoshida, H., Kitagawa, A., Asaoka, T., Eguchi, H., Akeda, Y., Tomono, K. Ceftriaxone-induced Neurotoxicity in a Patient after Pancreas-Kidney Transplantation. *Intern. Med.* **56**, 3103–3107 (2017).
38. Hervers, W. & Luddens, H. The diversity of GABA<sub>A</sub>-Rs. Pharmacological and electrophysiological properties of gamma-aminobutyric acid channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* **18**, 35–86 (1998).
39. Hori S, Kurioka S, Matsuda M, et al. Inhibitory effect of cephalosporins on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding in rat synaptic membranes. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 650–651 (1985).

40. Huguenard, J. R. & Alger, B. E. Whole-cell voltage-clamp study of the fading of GABA-activated currents in acutely dissociated hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **56**, 1–18 (1986).
41. Janssen, S., Bloem, B. R. & van de Warrenburg, B. P. The clinical heterogeneity of drug-induced myoclonus: an illustrated review. *J. Neurol.* **264**, 1559–1566 (2017).
42. Jelenkovic, A. V., Jovanovic, M. D., Stanimirovic, D. D., Bokonjic, D. D., Ocic, G. G., Boskovic, B. S. Beneficial effects of ceftriaxone against pentylenetetrazole-evoked convulsions. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **233**, 1389–94 (2008).
43. Johnson, E., Hannawi, Y., Martinez, N. C. & Ritzl, E. K. Cefepime-Associated SIRPIDs in a Patient With Normal Renal Function. *The Neurohospitalist* **6**, 167–169 (2016).
44. Kaneda, M., Nakamura, H. & Akaike, N. Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci. Res.* **5**, 299–315 (1988).
45. Kamei, C., Sunami, A. & Tasaka, K. Epileptogenic Activity of Cephalosporins in Rats and Their Structure-Activity Relationship. *Epilepsia* **24**, 431–439 (1983).
46. Kaphingst, K. A., Persky, S. & Lachance, C. NIH Public Access. **14**, 384–399 (2010).
47. Karlsson, U., Druzin, M. & Johansson, S. Cl<sup>−</sup> concentration changes and desensitization of GABA<sub>A</sub> and glycine receptors. *J. Gen. Physiol.* **138**, 609–626 (2011).
48. Kay, A. R. & Wong, R. K. S. Isolation of neurons suitable for patch clamping from adult mammalian central nervous systems. *J. Neurosci. Methods* **16**, 227–238 (1986).
49. Khasani, S., Gill, S., Semenova, L. & Sarva, H. Predominant jaw myoclonus from cefepime toxicity: a case report and a review of the literature. *J. Mov. Disord.* **8**, 144–146 (2015).
50. Kim, S., Lee, I., Park, S., Lee, J. Cefepime Neurotoxicity in Patients with Renal Insufficiency. *Ann. Rehabil. Med.* 159–162 (2012).
51. Korshoej, A. R., Holm, M. M., Jensen, K. & Lambert, J. D. C. Kinetic analysis of evoked IPSCs discloses mechanism of antagonism of synaptic GABA<sub>A</sub> receptors by picrotoxin. *Br. J. Pharmacol.* **159**, 636–649 (2010).
52. Lam, S. & Gomolin, I. H. Cefepime neurotoxicity: Case report, pharmacokinetic considerations, and literature review. *Pharmacotherapy* **26**, 1169–1174 (2006).
53. Lamothe, F., Buclin, T., Pascual, A., Vora, S., Bolay, S., Decosterd, L. A., Calandra, T., Marchetti, O. High cefepime plasma concentrations and neurological toxicity in febrile neutropenic patients with mild impairment of renal function. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4360–4367 (2010).
54. Lipski, J., Wan, C. K., Bai, J. Z., Pi, R., Li, D., Donnelly, D. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience* **146**, 617–629 (2007).

55. Lu, T., Rubio, M. E. & Trussell, L. O. Glycinergic Transmission Shaped by the Corelease of GABA in a Mammalian Auditory Synapse. *Neuron* **57**, 524–535 (2008).
56. McDonald, C., Cotta, M. O., Little, P. J., McWhinney, B., Ungerer, J. P., Lipman, J., Roberts, J. A. Is high-dose beta-lactam therapy associated with excessive drug toxicity in critically ill patients? *Minerva Anesthesiol.* **82**, 957–965 (2016).
57. Nishimura, T., Schwarzer, C., Gasser, E., Kato, N., Vezzani, A., Sperk, G. Altered expression of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subunit mRNAs in the hippocampus after kindling and electrically induced status epilepticus. *Neuroscience* **134**, 691–704 (2005).
58. Olsen, R. W. & Avoli, M. GABA and Epileptogenesis Richard. *Epilepsia* **38**, 399–407 (1997).
59. Payne, L. E., Gagnon, D. J., Riker, R. R., Seder, D. B., Glisic, E. K., Morris, J. G., Fraser, Gilles L. Cefepime-induced neurotoxicity: A systematic review. *Crit. Care* **21**, 1–8 (2017).
60. Rossokhin, A. V., Sharonova, I. N., Bukanova, J. V., Kolbaev, S. N. & Skrebitsky, V. G. Block of GABA<sub>A</sub> receptor ion channel by penicillin: Electrophysiological and modeling insights toward the mechanism. *Mol. Cell. Neurosci.* **63**, 72–82 (2014).
61. Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Jin, L., Hoberg, M. D., Vidensky, S., Chung, D. S., Shuy, V. T., Bruijn, L. I., Su, Z. Z., Gupta, P., Fisher, P. B.  $\beta$ -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* **433**, 73–77 (2005).
62. Safadi, S., Mao, M. & Dillon, J. J. Ceftriaxone-Induced Acute Encephalopathy in a Peritoneal Dialysis Patient. *Case Reports Nephrol.* **2014**, 1–4 (2014).
63. Sieghart, W. Allosteric modulation of GABA<sub>A</sub> receptors via multiple drug-binding sites. *Advances in Pharmacology* **72**, (Elsevier Inc., 2015).
64. Sugimoto, J., Tanaka, M., Sugiyama, K., Ito, Y., Aizawa, H., Soma, M., Shimizu, T., Mitani, A., Tanaka, K. Region-specific deletions of the glutamate transporter GLT1 differentially affect seizure activity and neurodegeneration in mice. *Glia* **66**, 777–788 (2018).
65. Sugimoto, M., Fukami, S., Kayakiri, H., Yamazaki, S., Matsuoka, N., Uchida, I., Mashimo, T. The  $\beta$ -lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of action at GABA<sub>A</sub> receptors. 427–432 (2002).
66. Sutter, R., Rüegg, S. & Tschudin-Sutter, S. Seizures as adverse events of antibiotic drugs : A systematic review. *Neurology* **85**, 1332–1341 (2015).
67. Tanaka, A., Takechi, K., Watanabe, S., Tanaka, M., Suemaru, K., Araki, H., Convulsive liability of cefepime and meropenem in normal and corneal kindled mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4380–4383 (2014).

68. Uyanikgil, Y., Özkeşkek, K., Çavuşoğlu, T., Solmaz, V., Tümer, M. K., Erbas, O. Positive effects of ceftriaxone on pentylenetetrazol-induced convulsion model in rats. *Int. J. Neurosci.* **126**, 70–75 (2016).
69. Wall, M. J. Competitive GABA<sub>A</sub> receptor antagonists increase the proportion of functional high-affinity  $\alpha 6$  subunit-containing receptors in granule cells of adult rat cerebellum. *Neuropharmacology* **44**, 56–69 (2003).
70. Xu, X. J., Roberts, D., Zhu, G. N. & Chang, Y. C. Competitive antagonists facilitate the recovery from desensitization of  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Acta Pharmacol. Sin.* **37**, 1020–1030 (2016).
71. Yahav, D., Paul, M., Fraser, A., Sarid, N. & Leibovici, L. Efficacy and safety of cefepime: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 338–348 (2007).
72. Yamazaki, S. *et al.* Intracerebroventricular injection of the antibiotic cefoselis produces convulsion in mice via inhibition of GABA receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **74**, 53–59 (2002).
73. Yelhekar, T. D., Druzin, M., Karlsson, U., Blomqvist, E. & Johansson, S. How to Properly Measure a Current-Voltage Relation?—Interpolation vs. Ramp Methods Applied to Studies of GABA<sub>A</sub> Receptors. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, (2016).
74. Yoshitani, T., Yagi, H., Inotsume, N. & Yasuhara, M. Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1077–83 (2002).
75. Zareifopoulos, N. & Panayiotakopoulos, G. Neuropsychiatric Effects of Antimicrobial Agents. *Clin. Drug Investig.* **37**, 423–437 (2017).